# Ac anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles

Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires (ANCA : *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*) sont des marqueurs pour le diagnostic des patients atteints de vascularites systémiques nécrosantes tels la granulomatose de Wegener, les polyangéites microscopiques, le syndrome de Churg et Strauss et les glomérulonéphrites nécrosantes focales en croissants. Ils reconnaissent des cibles antigéniques présentes dans les granules des polynucléaires neutrophiles (PNN), principalement les granules primaires, et dans les lysosomes des monocytes.

Deux aspects principaux de fluorescence sont décrits en IFI : cytoplasmique (cANCA) et périnucléaire (pANCA). Les cibles antigéniques des ANCA sont localisées dans les granules des polynucléaires neutrophiles.

Outre leur intérêt diagnostique, ils sont également utiles au suivi de certaines de ces affections, au moins pour la granulomatose de Wegener où l'évolution de leur titre corrèle avec l'activité de la maladie.

De nombreux arguments expérimentaux suggèrent leur rôle pathogène dans ces maladies, où ils activeraient les polynucléaires neutrophiles et les monocytes dans les vaisseaux de petit calibre et les capillaires glomérulaires, ce qui aboutirait aux lésions anatomiques, avec infiltrat inflammatoire et nécrose, qui définissent ces vascularites nécrosantes.

En revanche, dans les vascularites touchant les vaisseaux de moyen ou de gros calibre, comme dans la maladie de Horton ou la maladie de Takayasu, on ne retrouve jamais d'ANCA.

### *Autoantigènes et autoanticorps*

Les PNN patrouillent à l'état quiescent dans le compartiment vasculaire. Ils sont activés par des messagers : les chémokines ou chémoattractants (peptides N-formyl méthionylés, interleukine 8, C5a…) qui diffusent d'un foyer inflammatoire, puis attirés dans le compartiment extra-vasculaire par interaction avec les cellules endothéliales, grâce aux molécules d'adhérence. Pour pouvoir adapter leur morphologie et leur physiologie aux variations de leur micro-environnement, ils sont équipés de granules et de vésicules différant par les molécules qu'elles contiennent.

On distingue les granules azurophiles (ou primaires, ou α), les granules spécifiques (ou secondaires, ou neutrophiles, ou β), les granules de type gélatinase et les vésicules sécrétoires. Ces dernières, d'origine endocytaire, contiennent des molécules plasmatiques qui sont excrétées par fusion à la membrane : certains récepteurs membranaires sont ainsi renouvelés, impliqués notamment dans les phénomènes d'adhérence. La disponibilité immédiate de ces molécules permet aux PNN d'interagir avec les cellules endothéliales et la matrice intercellulaire sans libération du contenu potentiellement toxique des granules (tableau 2).

Les granules secondaires, peroxydase négatifs, forment un ensemble hétérogène, depuis les granules très riches en lactoferrine et dépourvus de gélatinase jusqu'à ceux très riches en gélatinase et dépourvus de lactoferrine (réalisant au maximum les granules de type gélatinase), en passant par des intermédiaires contenant les deux molécules en proportions variables. Lors de la diapédèse, les granules contenant la gélatinase sont mobilisés en second, après les vésicules, au contact du collagène de type IV, principal constituant de la membrane basale et substrat de la gélatinase. Ainsi, le PNN activé au sein d'un foyer tissulaire inflammatoire a relargué l'essentiel du contenu de ses vésicules et de ses granules secondaires, tout en conservant intactes ses réserves d'enzymes protéolytiques et bactéricides contenues dans ses granules primaires. Au contact des micro-organismes, il est donc en mesure d'exprimer à sa surface les récepteurs pour la phagocytose et ses fonctions « microbicides ».

Agents de l'immunité naturelle, ce sont les premiers leucocytes à rejoindre le site infectieux : ils sont en mesure de phagocyter et de tuer les micro-organismes grâce à leur équipement en molécules antibiotiques, enzymes protéolytiques, dérivés actifs de l'oxygène, avant même qu'une réponse immunitaire spécifique soit mise place. Ils y contribuent, dans un deuxième temps, par la libération des chimiokines et des défensines capables d'attirer lymphocytes et cellules dendritiques.

#### — *Protéinase 3*

La cible principale des cANCA est une sérine-protéase de 29 kDa : elle clive l'élastine, l'hémoglobine, la fibronectine, la laminine, la vitronectine, le collagène de type IV. Dans les phagosomes, la protéinase 3 (PR3) détruit les bactéries en association avec la cathepsine G, l'élastase et les radicaux libres d'oxygène. À la différence de l'élastase, de la myéloperoxydase et de la cathepsine G, elle est également présente dans les granules secondaires et les vésicules.

Elle est la cible antigénique préférentielle des cANCA caractéristiques de la granulomatose de Wegener ; elle est surexprimée lors de certaines leucémies myéloïdes aiguës ou chroniques.

La PR3 peut cliver l'IL8 et le C1-inhibiteur et inhiber la NADPH oxydase, ce qui concourt au maintien des

Tableau 2. Cibles antigéniques des ANCA

| Granules primaires | Granules secondaires | Granules gélatinases | Vésicules sécrétoires |
|---|---|---|---|
| **Azurocidine** | | | |
| **BPI** | | | |
| **Cathepsine G** | | | |
| **Élastase** | | | |
| **Glucuronidase** | | | |
| **Lysosyme** | **Lysosyme** | **Lysosyme** | |
| **Myéloperoxydase** | | | |
| **Protéinase 3** | **Protéinase 3** | **Protéinase 3** | |
| | **Lactoferrine** | | |
| Glycérophosphatase | Collagénase | Acétyl-transférase | Protéines plasmatiques |
| Mannosidase | Gélatinase | | |
| | Histaminase | | |
| | Sialidase | | |
| | Vit B12-bp | | |

Les cibles antigéniques des ANCA sont indiquées en gras.

manifestations inflammatoires. Elle peut se lier aux cellules endothéliales et entraîner leur apoptose (rôle dans la pathogénie de vascularites). Elle intervient dans le processus de différenciation de la lignée promyélocytaire HL60 (myéloblastine) : l'inhibition de son expression induit une inhibition de la prolifération et induit la différenciation ; cet effet est reproduit par des anticorps monoclonaux anti-PR3 (explication possible de l'hyperleucocytose au cours du Wegener).

On en retrouve dans la circulation et dans les tissus des patients atteints de Wegener.

Certains anticorps anti-PR3 inhibent l'action élastinolytique de la PR3, se liant donc au site actif.

Normalement, elle est soumise à une inhibition par les serpines (inhibiteurs des protéases à sérine), principalement l'α 1-antitrypsine et l'α 2-macroglobuline. Un déficit en α 1-antitrypsine est souvent associé aux vascularites. Le gène déficitaire *PiZ* est exprimé chez 20 % des patients atteints de vascularites à anti-PR3, contre 4,7 % dans la population générale. L'activité clinique de la maladie de Wegener est corrélée avec le pouvoir inhibiteur des cANCA vis-à-vis de la liaison PR3/α 1-antitrypsine.

La conformation tridimensionnelle de la PR3, imposée par ses quatre ponts disulfures, est importante pour sa reconnaissance par les anti-PR3 : les protéines recombinantes produites par des cellules de rat ou humaines conservent cette structure antigénique, ce qui n'est pas le cas dans les systèmes Baculovirus ou les bactéries.

### — *Myéloperoxydase*

Environ 50 % des pANCA retrouvés chez les patients atteints de vascularite systémique ou de glomérulonéphrite extra-capillaire pauci-immune sont spécifiques de la myéloperoxydase (MPO). Elle a été décrite en 1941 sous le nom de verdoperoxydase (elle est responsable de la couleur verte du pus). Elle est contenue dans les granules primaires ; c'est un puissant oxydant : elle permet la production d'un oxydant chloré, l'acide hypochloreux en présence d'halogénures, selon la réaction :

$$H_2O_2 + Cl^- + H_3O^+ \rightarrow HOCl + 2H_2O$$

L'acide hypochloreux est un puissant agent bactéricide ; il peut également inactiver des inhibiteurs de protéases et avoir ainsi un effet indirect dans la dégradation des tissus. Pourtant, le déficit en MPO (1 pour 2 000 à 4 000 individus) ne semble pas avoir de conséquences délétères.

Les anticorps anti-MPO sont dirigés contre des épitopes multiples et, pour certains, conformationnels, et n'interfèrent pas avec l'activité enzymatique. L'expression de MPO recombinante a été obtenue dans différentes lignées cellulaires d'origine myéloïde.

Les anticorps anti-MPO sont retrouvés dans 70 % des glomérulonéphrites extra-capillaires pauci-immunes, 60 % des micropolyangéites, 60 % des syndromes de Churg et Strauss et 10 % des maladies de Wegener. Contrairement aux anti-PR3, il ne semble pas qu'il y ait de corrélation entre leur titre et l'activité clinique de la maladie.

L'aspect pANCA est lié à une distribution artéfactuelle autour du noyau de certains antigènes, dont la MPO, lors de la fixation des préparations de PNN par l'éthanol. Une fixation par le formol respecte leur distribution cytoplasmique.

— *Élastase*

C'est une sérine-protéase présentant 54 % d'homologie avec la PR3. Elle est stockée dans les granules azurophiles. Des anticorps anti-élastase ont été décrits au cours de certaines vascularites, de lupus et dans des cas de glomérulonéphrites induites par l'hydralazine.

— *Cathepsine G*

C'est une autre sérine-protéase, de 29 kDa, contenue dans les granules primaires. Des anticorps anti-cathepsine G ont été décrits au cours de maladies de Wegener, de vascularites systémiques tels la polyangéite microscopique et le syndrome de Churg et Strauss. Ils sont aussi retrouvés au cours d'entérites inflammatoires chroniques comme la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn, d'hépatites autoimmunes, de cirrhose biliaire primitive, de cholangite sclérosante et de cirrhose alcoolique. Leur spécificité diagnostique est donc limitée.

— *BPI (bactericidal permeability increasing protein)*

Protéine cationique antimicrobienne de 57 kDa (elle a été aussi appelée CAP 57 pour *cationic antigenic protein*) présente dans les granules primaires, elle se lie au LPS des bactéries à Gram négatif et a des effets cytotoxiques ainsi que neutralisants sur les endotoxines libérées. Des anticorps anti-BPI ont été observés au cours de vascularites et de maladies inflammatoires du tube digestif, ainsi qu'au cours de mucoviscidoses infectées par *Pseudomonas*. Ils produisent une fluorescence de type cANCA quand ils sont positifs en IFI ; dans 50 % des cas, ils sont négatifs en IFI.

— *Lactoferrine, lysozyme*

Les anticorps reconnaissant les cibles antigéniques des granules secondaires sont rares. Ils sont retrouvés au cours de vascularites, de colites ulcéreuses, de cholangites sclérosantes, de polyarthrites rhumatoïdes, de lupus systémiques, d'arthrites inflammatoires et au cours de l'infection par le VIH. Les mécanismes d'action des anticorps anti-lactoferrine ne sont pas bien établis.

### *Méthodes de détection*

Les ANCA sont recherchés par technique d'immunofluorescence indirecte (IFI), sur des lames de PNN humains, avec une première dilution au 1/20. Leur spécificité est ensuite précisée par ELISA (anti-MPO, anti-PR3). Ce sont le plus souvent des IgG.

— *Technique IFI*

La fixation des PNN humains de groupe O par l'éthanol est responsable de la distribution particulière des autoantigènes reconnus par les ANCA :

- l'aspect cANCA est caractérisé par une fluorescence diffuse et granulaire du cytoplasme avec renforcement entre les lobes nucléaires. L'antigène est le plus souvent la PR3 ;
- l'aspect pANCA est particulier par la condensation de la fluorescence autour du noyau, sans marquage cytoplasmique. L'antigène est souvent la MPO.

Sur ces lames, les anticorps anti-nucléaires (ANA) peuvent avoir un aspect de pANCA. L'utilisation dans un second temps de cellules Hep-2 aidera à leur caractérisation.

D'autres autoanticorps peuvent donner un aspect voisin de celui des pANCA, on les appelle « pANCA atypiques », « xANCA », ou bien encore « NANA » (*nuclear associated neutrophil antibodies*).

Ces pANCA atypiques peuvent être rencontrés dans les maladies inflammatoires de l'intestin (rectocolite hémorragique), les hépatites autoimmunes, les cancers et les infections. Dans ces pathologies, il n'a pas été caractérisé d'antigène spécifique contre lequel ces xANCA réagissent.

L'utilisation d'autres fixateurs que l'éthanol peut aider à cette différenciation. Le formaldéhyde maintient les constituants dans les granules et empêche toute redistribution artéfactuelle : les pANCA et les cANCA observés sur lame fixée à l'éthanol auront le même aspect granuleux cytoplasmique sur lame fixée au formol. Les ANA et les xANCA ne réagissent pas sur ces cellules fixées au formol. La fixation des PNN au méthanol permet aussi de différencier les xANCA et les ANA, mais ce fixateur est moins utilisé que le formol (tableau 3).

**Tableau 3. Aspect des ANCA selon le fixateur des PNN**

| Type d'anticorps | Aspect en fixation éthanol | Aspect en fixation formol | Aspect en fixation méthanol | Aspect sur cellules Hep2 |
|---|---|---|---|---|
| cANCA | cANCA | cANCA | cANCA | Négatif |
| pANCA | pANCA | cANCA | Négatif | Négatif |
| xANCA | pANCA | Négatif | pANCA | Négatif |
| ANA | Nucléaire ou pANCA | Négatif | ANA | Nucléaire |

— *Technique ELISA*

La recherche des spécificités anti-MPO et/ou anti-PR3 est pratiquée pour tous les ANCA positifs en IFI, pour le diagnostic des vascularites. Il n'existe pas de technique permettant l'identification des xANCA associés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin pour lesquelles on doit se contenter de l'aspect en IFI.

Les antigènes utilisés peuvent être purifiés ou recombinants ; la technique peut être directe ou « en sandwich » par immunocapture, utilisant un premier anticorps monoclonal. Les techniques en capture semblent être plus sensibles pour la détection des anticorps anti-PR3.

D'autres techniques sont disponibles. Les immunoblots ou dot-blots sont des techniques unitaires, reposant sur le principe de l'ELISA. Ils fournissent un résultat qualitatif ou semi-quantitatif, utile pour un diagnostic d'urgence. En cytofluorimétrie, les protéines-cibles sont couplées à des particules, et la réaction Ag-Ac est lue par un cytomètre de flux (technologie Luminex®).

Pour suivre l'évolution de la maladie, il est préférable d'utiliser le titre de fluorescence plutôt que l'ELISA. Les rechutes sont fréquentes dans la maladie de Wegener (18–64 % des patients), plus que dans la micropolyangéite (8–35 %). Il est conseillé de titrer les ANCA tous les 3 mois la première année au cours du Wegener. Au cours du traitement, on doit voir une diminution de la fluorescence. Une variation n'est significative que si elle est supérieure ou égale à trois dilutions. Une réascension du taux de fluorescence aurait une valeur prédictive pour le diagnostic de rechute.

Tous les résultats doivent bien sûr être interprétés en tenant compte des données cliniques.

## Association clinique

— *Vascularites*

Les ANCA sont associés à des vascularites primitives touchant les vaisseaux de petit calibre. Ce sont des affections rares, d'expression clinique très polymorphe. Ce sont la granulomatose de Wegener, la maladie de Churg et Strauss, la micropolyangéite. Les associations cANCA/anti-PR3 d'une part, et pANCA/anti-MPO d'autre part permettent le diagnostic de ces maladies avec une excellente spécificité (98,6 %), et une sensibilité de 85,5 %.

Cependant, 10 à 20 % des cas de cANCA ou de pANCA positifs en IFI et négatifs en ELISA correspondent à d'authentiques vascularites. À l'inverse, 5 % des sérums peuvent être négatifs en IFI et positifs en ELISA, invitant à pratiquer cette recherche à chaque fois que le tableau clinique permet de suspecter un défaut de sensibilité de l'IFI (tableau 4).

— *Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin*

Les xANCA sont décrits comme les marqueurs de la rectocolite hémorragique (RCH), ainsi que de pathologies autoimmunes hépatiques (cholangite sclérosante primitive, hépatite autoimmune de type 1). La RCH correspond à une atteinte inflammatoire chronique de la muqueuse colique avec atteinte rectale quasi constante, évoluant par poussées. Elle survient chez l'adulte jeune (20–30 ans). Les principaux symptômes sont des douleurs classiquement locali-

**Tableau 4. Fréquence des ANCA caractérisés en IFI**

| | cANCA | pANCA | pANCA atypiques ou xANCA |
|---|---|---|---|
| Wegener | 75 % | 15 % | |
| Micropolyangéite | 35 % | 60 % | |
| Churg et Strauss | 10 % | 60 % | |
| Glomérulonéphrite nécrosante focale sans dépôt d'Ig | 20 % | 70 % | |
| Périartérite noueuse | Rares | Rares | |
| Glomérulonéphrite à Ac anti-MBG | | 25 % | |
| Purpura rhumatoïde | IgA | | |
| Maladies systémiques : lupus, PR, Gougerot-Sjögren | | | 30 % |
| Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : | | | |
| – rectocolite hémorragique | | | 70 % |
| – cholangite sclérosante primitive | | | 70 % |
| – maladie de Crohn | | | 10 % |
| – hépatites autoimmunes | | | 30 % |
| Médicaments (minocycline, propylthiouracile) | | | + |
| Tuberculose, aspergillose, infection par VIH | | | + |
| Mucoviscidose, endocardites | + | | |

Noter que dans 10 à 30 % des cas de maladie de Wegener et de micropolyangéites, des anticorps anti-membrane basale glomérulaire sont associés.

sées dans la fosse iliaque gauche, une diarrhée hydrique accompagnée de pus et de sang, des rectorragies constantes. Les manifestations extra-intestinales sont des arthrites et surtout la cholangite sclérosante.

La maladie de Crohn est associée à la présence d'anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). On a montré que la combinaison ANCA + ASCA est plus discriminative que les tests pris isolément, pour le diagnostic de RCH et de Crohn. En effet, la combinaison xANCA–/ASCA+ est en faveur d'une maladie de Crohn avec une valeur prédictive positive de plus de 90 %, tandis que la combinaison xANCA+/ASCA– est en faveur d'une RCH.

☞ *Ac anti-membrane basale glomérulaire, Ac anti-Saccharomyces cerevisiae, Hépatites autoimmunes*

📖 Deguillaume Y, Renaudineau Y, Chaline L, Saraux A, Nousbaum JB, Youinou P.
Les nouveaux ANCA : leur mode d'emploi.
Immunoanal Biol Spé 2006 ; 21 : 301-307.

Mérens A, Nizou JY, Duvic C, Nicand E.
Polyangéite microscopique et pANCA.
Rev Fr Lab 2007 ; 37/389 : 59-63.